

Détermination structurale de la cassiicoline, la toxine glycosylée de *Corynespora cassiicola*.

Corynespora cassiicola est un champignon phytopathogène nécrotrophe capable d'infecter plus de 70 plantes hôtes, parmi lesquelles, la tomate, le concombre, le coton, le soja ou l'hévéa. Dans le cas de l'hévéa, la pathologie induite par *C. cassiicola* se manifeste par des défoliations massives générant des pertes de productions importantes. Cette infection est en constante progression dans toutes les zones de production.

Nous avons isolé et purifié le facteur déterminant de la pathogénicité du champignon¹ : la cassiicoline, une protéine de 2885 Da constituée de 27 résidus dont 6 cystéines, toutes impliquées en pont disulfure (réaction d'Ellman). Cependant, la séquence obtenue par Edman était encore partielle lorsque l'étude RMN de la cassiicoline en solution a débuté.

Philippe Barthe¹, Valérie Pujade-Renaud², Marie-Pierre Duviau³, Frédéric de Lamotte³, Christian Roumestand¹.

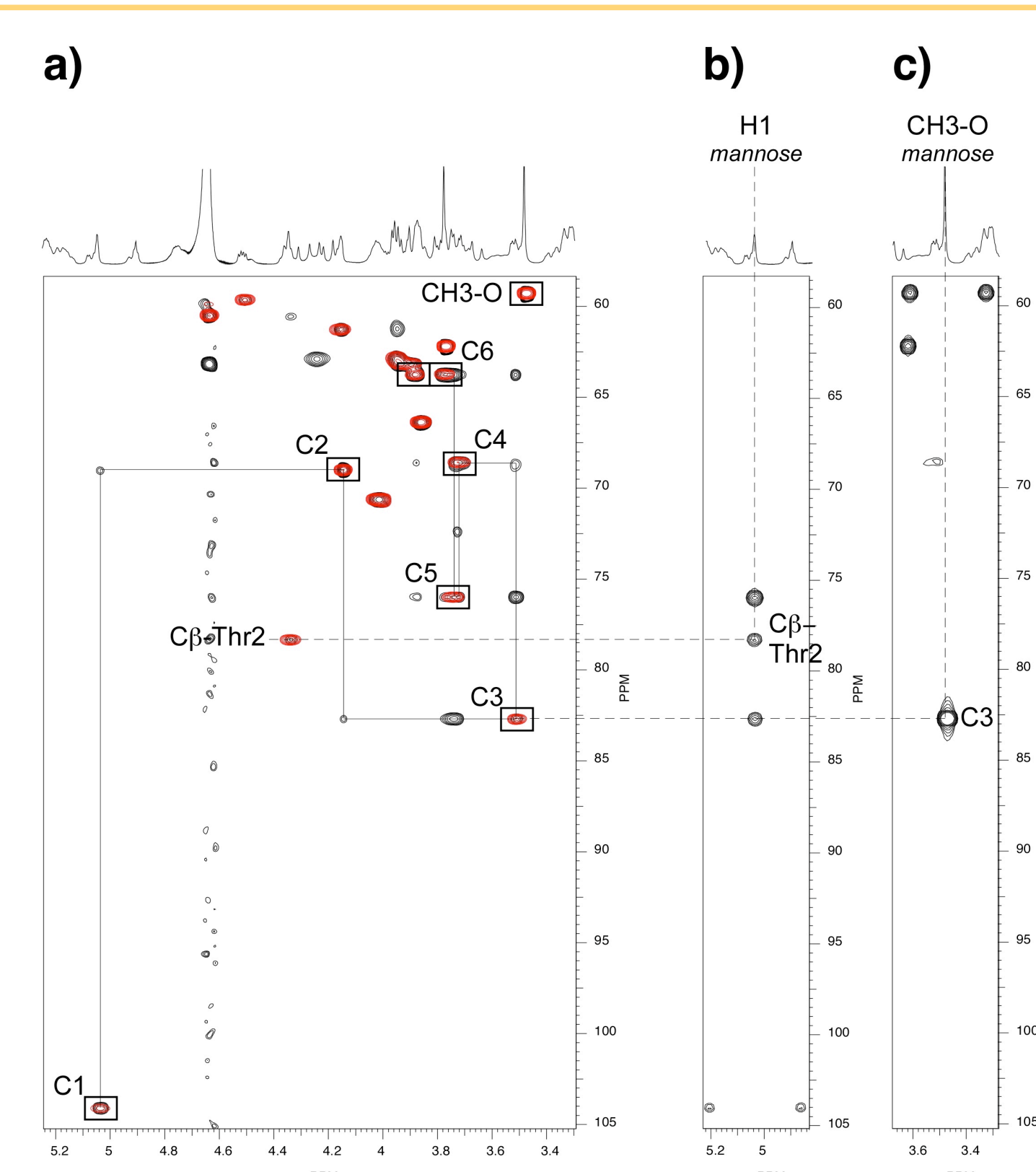
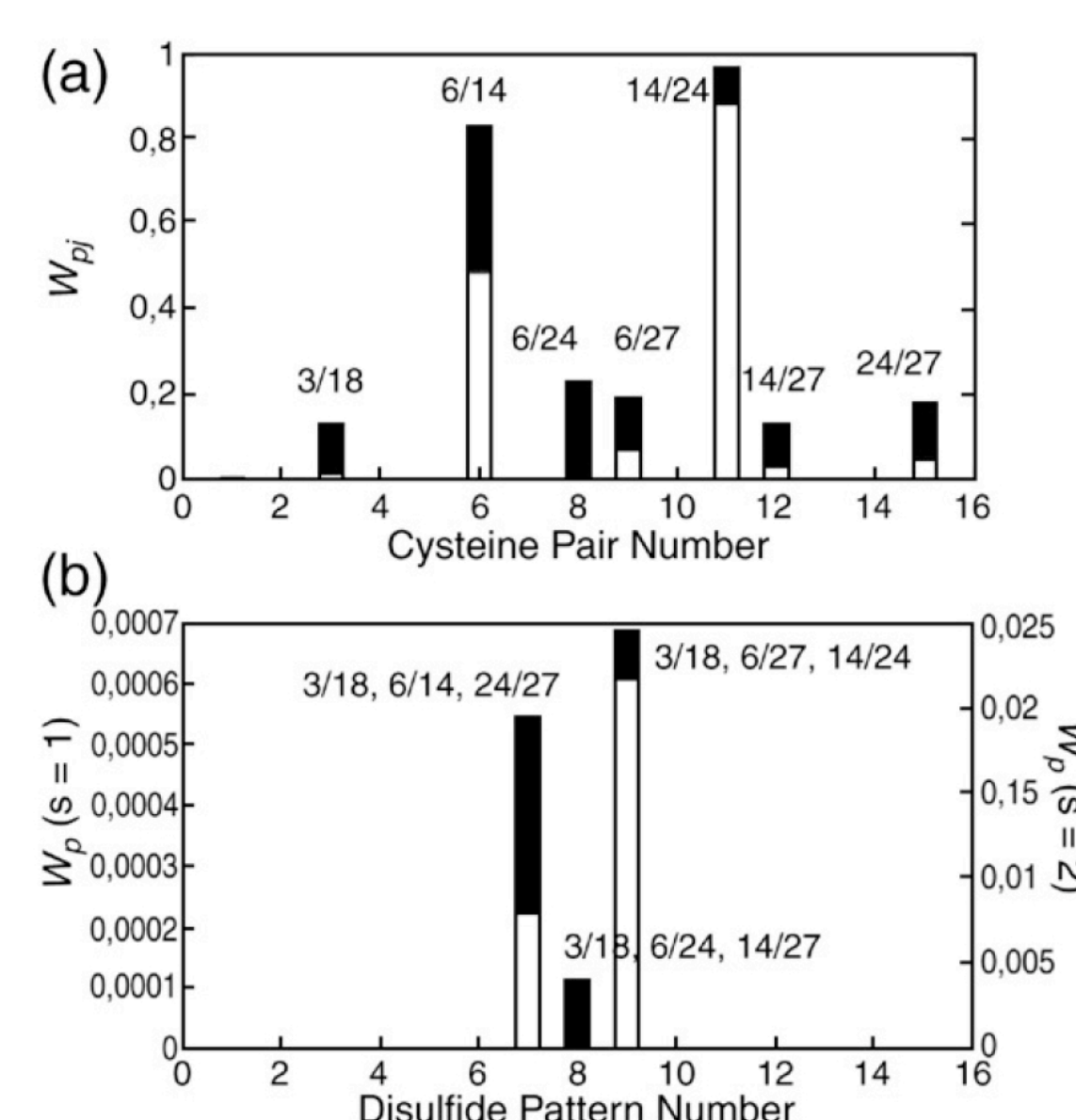
1 - Centre de Biochimie Structurale, 29 rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France.
2 - CIRAD, TA 80/03, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.
3 - INRA, Bat. 21, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.



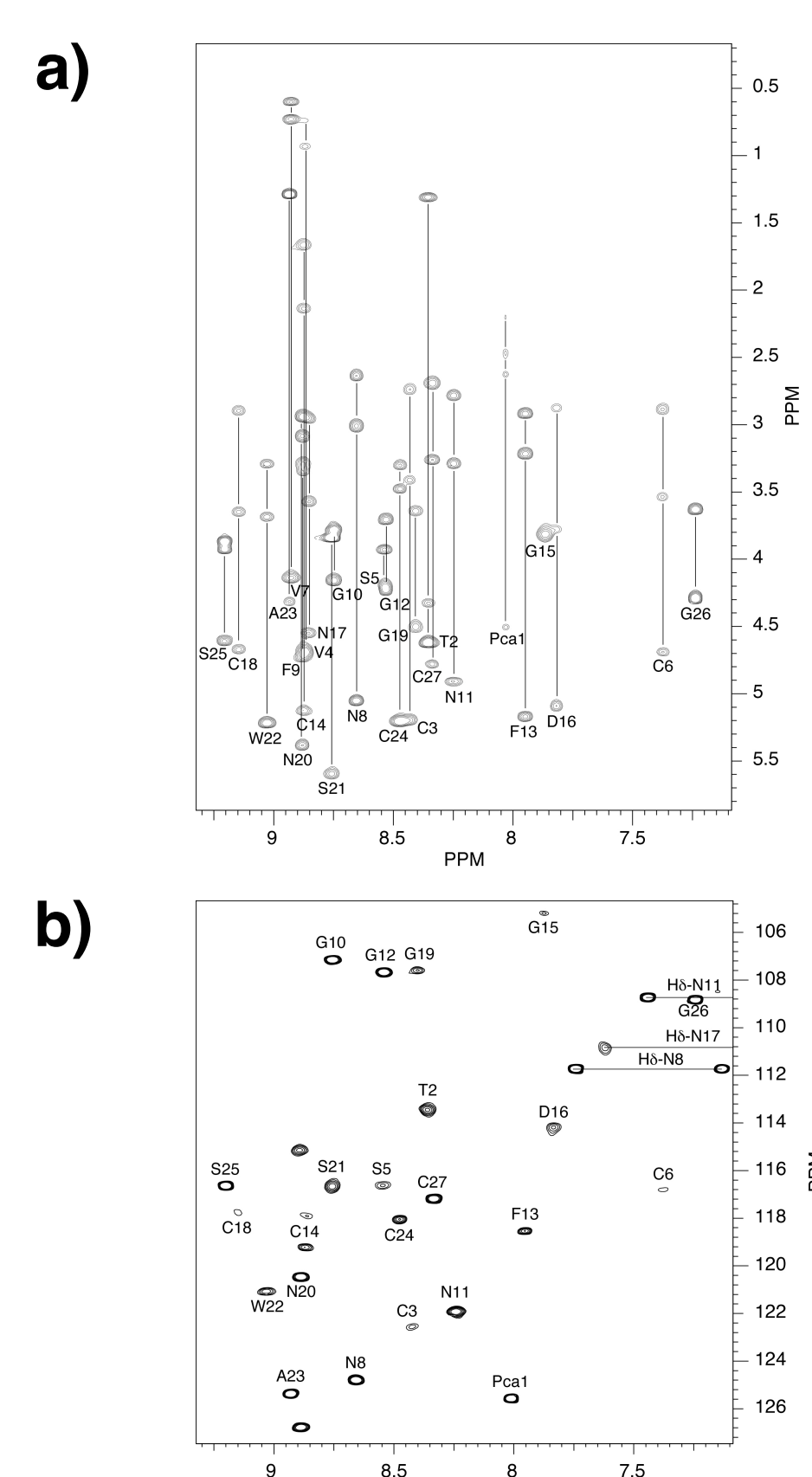
Essais biologiques sur des feuilles d'hévéa. L'échantillon et sa dilution au dixième ont été placés respectivement à gauche et à droite de chaque feuille, après scarification. Feuille de gauche, fraction purifiée du milieu de culture de *C. cassiicola* Feuille de droite, contrôle négatif (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5).

Identification des ponts disulfures par analyse statistique des distances C β -C β des 6 cystéines. (a) ω_{ij} est le poids pour les 15 ponts disulfures possibles calculé à partir de 20 conformères de cassiicoline avec le paramètre de dispersion $s=1$ (barre blanche) et $s=2$ (barre noire). (b) ω_p est la probabilité pour chacune des 15 combinaisons (de 3 ponts disulfures) possibles.

$$\omega_{ij} = 1/N \sum_{n=1}^N \exp\left(-\left(0.5(r_{ij}^n - r_0)^2 / s^2\right)\right) \quad \omega_p = \prod \omega_{ij}$$



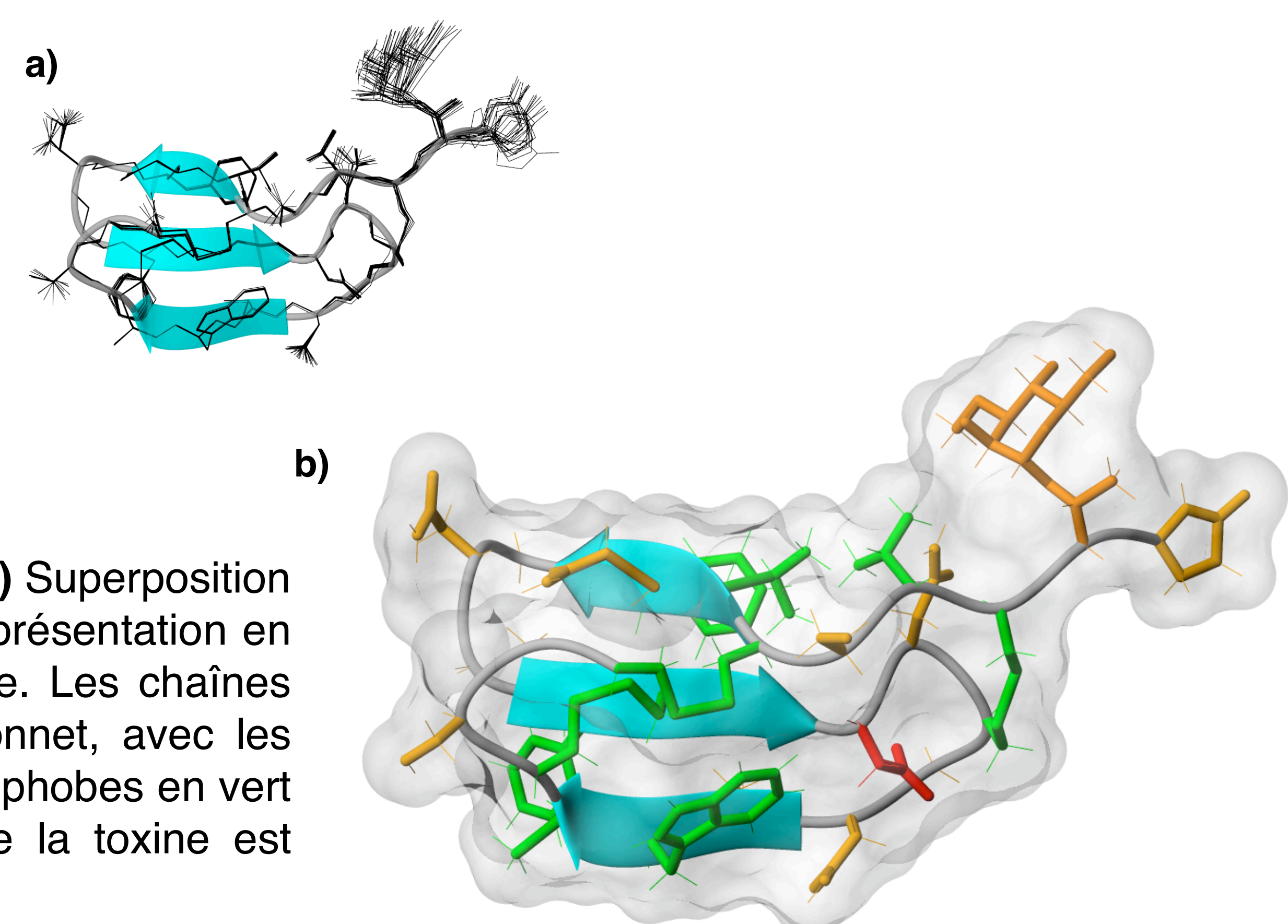
La cassiicoline est O-glycosylée sur la Thréonine 2. (a) Superposition des spectres [1H-13C]-HSQC (rouge) et [1H-13C]-HSQC-TOCSY (noir) de la cassiicoline. Les carbones du sucre sont anotés. (b) et (c) Bandelettes extraites du spectre ge-HMBC montrant les connections entre le proton anomérique du sucre et le C β de la Thr2 (b) et la méthylation du C3 du mannose (c).



Attribution de la cassiicoline.

(a) Spectre TOCSY (80 ms) de la cassiicoline (1 mM) à 20°C, pH 3.3, montrant les connections NH-aliphatiques. (b) Spectre [1H-15N]-HSQC de la cassiicoline enregistré en abondance naturelle.

Structure 3D de la cassiicoline. (a) Superposition des 20 meilleures structures. (b) Représentation en ruban du squelette de la cassiicoline. Les chaînes latérales sont représentées en bâtonnet, avec les résidus polaires en orange, les hydrophobes en vert et l'acide en rouge. L'enveloppe de la toxine est matérialisée en gris clair.



La RMN a permis d'obtenir la séquence complète de la protéine en levant les ambiguïtés qui persistaient suite au séquençage d'Edman. Les expériences RMN du ¹³C ont démontré la O-glycosylation de la Thr2 par un α -mannose O-méthylé en C3. Finalement, la structure tri-dimensionnelle de cette toxine a été déterminée avec une grande précision². Elle est constituée d'un feuillet β dont les 3 brins β anti-parallèles sont stabilisés par 3 ponts-disulfures.